

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

A61K 35/78

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98800670.7

[43]公开日 1999 年 8 月 25 日

[11]公开号 CN 1226831A

[22]申请日 98.4.16 [21]申请号 98800670.7

[30]优先权

[32]97.4.16 [33]NL [31]1005821

[86]国际申请 PCT/NL98/00214 98.4.16

[87]国际公布 WO98/46244 英 98.10.22

[85]进入国家阶段日期 99.1.20

[71]申请人 菲瓦公开有限公司

地址 荷属安的列斯库拉索岛

共同申请人 H·J·M·F·吉莱森

[72]发明人 H·J·M·F·吉莱森

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 周中琦

权利要求书 4 页 说明书 4 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 蔬菜提取物及其制备方法和其在人类及兽
医学中的应用

[57]摘要

本发明涉及通过含以下步骤的方法得到的生物活性
植物提取物:a)榨压蔬菜材 料成浆状;b)将所得浆状物
用水性或有机溶剂进行冷或热处理;c)去除溶剂 直至得
到所需的浓度水平;d)选择性地,通过一种或多种下列方
法进一步纯化 这样得到的提取物:热凝固术、用硫酸铵
纯化、沉淀、在凝胶或离子交换树脂 上层析。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

- 1.一种生物活性植物提取物，通过含以下步骤的方法得到：
 - a)榨压蔬菜材料成浆状；
 - b)将所得浆状物用水性或有机溶剂进行冷或热处理；
 - c)去除溶剂直至得到所需的浓度水平；
 - d)选择性地，通过一种或多种下列方法进一步纯化这样得到的提取物：热凝固术、用硫酸铵纯化、沉淀、在凝胶或离子交换树脂上层析。
- 2.根据权利要求1所述的提取物，从选自马铃薯、萝卜、芜菁、甜菜、胡萝卜、洋姜、甘薯、油菜、黄瓜、西葫芦、小西葫芦和西红柿的蔬菜中得到。
- 3.生物活性化合物，通过在 Q hyper DTM 20 - 凝胶层析柱上进一步层析纯化根据权利要求1或2所述的提取物，洗脱柱子并随后收集在所选洗脱液浓度洗脱的组分得到。
- 4.根据权利要求3所述的生物活性化合物，于 0.09M NaCl 时洗脱。
- 5.根据权利要求3所述的生物活性化合物，于 0.15M NaCl 时洗脱。
- 6.根据权利要求3所述的生物活性化合物，于 0.21M NaCl 时洗脱。
- 7.根据权利要求3所述的生物活性化合物，于 0.25M NaCl 时洗脱。
- 8.根据权利要求3所述的生物活性化合物，于 0.32M NaCl 时洗脱。
- 9.根据权利要求3所述的生物活性化合物，于 0.45M NaCl 时洗脱。
- 10.根据权利要求3所述的生物活性化合物，于 0.52M NaCl 时洗脱。
- 11.根据权利要求3所述的生物活性化合物，于 0.70M NaCl 时洗脱。

脱。

12.根据权利要求 3 所述的生物活性化合物，于 0.78M NaCl 时洗脱。

13.根据权利要求 3 所述的生物活性化合物，于 0.85M NaCl 时洗脱。

14.根据权利要求 3 所述的生物活性化合物，于 1.02M NaCl 时洗脱。

15.生物活性化合物，通过将根据权利要求 1 或 2 所述的提取物进一步上样通过 Q hyper DTM 20 - 凝胶层析柱，随后在 QMA - 凝胶层析柱上进一步纯化洗脱物，洗脱柱子并随后收集在所选洗脱液浓度洗脱的组分得到。

16.根据权利要求 15 所述的生物活性化合物，于 0.05M NaCl 时洗脱。

17.根据权利要求 15 所述的生物活性化合物，于 0.08M NaCl 时洗脱。

18.根据权利要求 15 所述的生物活性化合物，于 0.12M NaCl 时洗脱。

19.根据权利要求 15 所述的生物活性化合物，于 0.20M NaCl 时洗脱。

20.根据权利要求 15 所述的生物活性化合物，于 0.27M NaCl 时洗脱。

21.根据权利要求 4 - 17， 9 - 14， 16， 17， 19 和 20 所述的生物活性化合物，用作真核细胞的促有丝分裂剂。

22.根据权利要求 8 和 8 所述的生物活性化合物，用作细胞生长抑制剂。

23.根据权利要求 6， 9 和 19 所述的生物活性化合物，用作刺激代谢的制剂。

24.根据权利要求 4， 5， 11， 13 和 14 所述的生物活性化合物，用作微生物的促有丝分裂剂。



25.一种或多种根据权利要求 4 - 7, 9 - 14, 16, 17, 19 和 20 所述的生物活性化合物的组合, 用作真核细胞的促有丝分裂剂。

26.一种或多种根据权利要求 8 和 18 所述的生物活性化合物的组合, 用作细胞生长抑制剂。

27.一种或多种根据权利要求 4, 5, 11, 13 和 14 所述的生物活性化合物的组合, 用作微生物的促有丝分裂剂。

28.一种制备植物提取物的方法, 该提取物具有包括影响细胞生长的生物活性, 该方法包括以下步骤:

- a) 榨压蔬菜材料成浆状;
- b) 将所得浆状物用水性或有机溶剂进行冷或热处理;
- c) 去除溶剂直至得到所需的浓度水平;
- d) 选择性地, 通过一种或多种下列方法进一步纯化这样得到的提取物: 热凝固术、用硫酸铵纯化、沉淀、在凝胶或离子交换树脂上层析。

29.根据权利要求 28 所述的方法, 其特征在于:

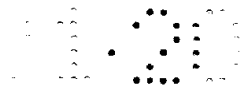
- a) 所得浆状物的处理是用冷水进行,
- b) 这样得到的物质通过离心或过滤浓缩,
- c) 随后在存在酒精、正辛酸、乙酸和硫酸铵的情况下进行热凝固术,
- d) 将这样得到的提取物离心,
- e) 上清用于超滤以得到提取物。

30.根据权利要求 28 或 29 所述的方法, 进一步包括将提取物在 Q hyper DTM 20 - 凝胶上层析分离并用 NaCl 梯度洗脱柱子。

31.根据权利要求 28 或 29 所述的方法, 进一步包括将提取物上样通过 Q hyper DTM 20 - 凝胶层析柱并随后在含 QMA - 凝胶的柱上层析分离得到的洗脱物并用 NaCl 梯度洗脱柱子。

32.人类或兽医学使用的药物, 包含至少一种下列成分: 根据权利要求 1 或 2 所述的提取物, 根据权利要求 3 - 24 所述的生物活性化合物或根据权利要求 25 - 27 所述的组合。

33.一种培养基, 包含至少一种下列成分: 根据权利要求 1 或 2 所



述的提取物，根据权利要求 3 - 24 所述的生物活性化合物或根据权利要求 25 - 27 所述的组合。

说明书

蔬菜提取物及其制备方法和其在人类及兽医学中的应用

本发明涉及新的蔬菜提取物及其制备方法, 和这些蔬菜提取物在生物技术和治疗中的应用, 这种应用是由于它们作为细胞生长因子和生长抑制因子的活性。

植物常常具有不可怀疑的治疗性能或含具治疗性能的活性成分。特别是对于难于治疗的疾病, 如癌症等, 植物是潜在的医药来源。

根据本发明, 现已出乎意料地发现, 具有生物活性的提取物可从植物, 特别是含糖精、蛋白、糖蛋白和萜的植物中制备。为此目的, 可使用的蔬菜是比如马铃薯、萝卜、芜菁、甜菜、胡萝卜、洋姜、甘薯、油菜、黄瓜、西葫芦、小西葫芦、西红柿等。此目录不是完全列举。

根据本发明的提取物按照以下连续的步骤制备:

- 榨压所选蔬菜成浆状;
- 用水性或有机溶剂冷或热处理所得的浆状物;
- 将溶剂蒸发直至得到所需的浓度水平;
- 选择性地, 通过一种或多种下列方法比如热凝固术, 用硫酸铵纯化、沉淀、在凝胶或离子交换树脂上层析进一步纯化这样得到的提取物。

在以 BIO MEDIA 公司的名义申请的法国专利申请 FR - A - 2 732 347 中描述了一种提取方法, 用这种方法能得到具确定活性的三个组分。此处引用此公开文件的内容。

根据本发明, 提取物进一步得到纯化, 分别得到具分子量 5,000、7,500、10,000、12,000、15,000、20,000、30,000、40,000、65,000、82,000、105,000、130,000、180,000、200,000、220,000、250,000 道尔顿的 16 种糖精类、蛋白、糖蛋白、萜和肽分子。所有这些分子都易溶于水。

这些分子可通过在 Q hyper DTM 20 - 凝胶上层析进一步纯化得到。由此在 0.09M, 0.15M, 0.21M, 0.25M, 0.32M, 0.45M, 0.52M, 0.70M,

0.78M, 0.85M, 1.02M NaCl 洗脱得到 11 种分子。

在洗脱物中低分子量的成分可以通过在以 QMA - 凝胶为基础的第二种柱子上层析进一步得到纯化。在 0.05M, 0.08M, 0.12M, 0.20M 和 0.27M NaCl 洗脱得到五种组分。

在这种方法中得到的 16 种不同成分的活性如实施例 1 中描述的得到测定。

在实施例 1 中描述的毒理学和药理学研究表明根据本发明的化合物没有毒性，也表明了它们的显著性能。

根据本发明的具促有丝分裂活性的 14 种分子每种都可以作为促有丝分裂活性物质使用或以不同浓度用于不同的目的，如生产用于研究和诊断的培养基、生产人类或动物医疗中使用的分子和疫苗，或用于化妆品。

能刺激微生物繁殖的五种分子可以有效地用于发酵培养基领域，这些发酵培养基用于生产人类和动物治疗、化妆品或农业综合企业所需的微生物或分子。

对代谢有影响的三种分子将在人类和动物医疗的体重减轻或生长问题病例中有效施用，或用于细菌诊断学。

具细胞抑制活性的两种分子由于它们的细胞生长抑制能力可有效地作为抗肿瘤剂和抗癌剂施用。

本发明将在以下非限制性实施例中进一步得到说明。

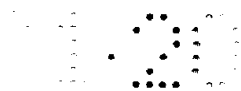
实施例

实施例 1 活性物质的分离

将 1000g 新鲜健康的西葫芦压碎以得到细密的菜泥。用这种方法得到的菜泥用 500g 冷水处理 2 小时。然后将所得的糊状物 (E1) 离心或过滤以收集浆状物 (E2) 。

然后通过含乙醇、正辛酸、乙酸和硫酸铵的热凝固术纯化这样得到的提取物。离心后收集上清，并且随后用于超滤以除去特定的盐类并得到滤液的正确浓度。

将这样得到的滤液在 Q hyper DTM 20 - 凝胶上的层析纯化，在 0.09M 、 0.15M 、 0.21M 、 0.25M 、 0.32M 、 0.45M 、 0.52M 、



0.70M、0.78M、0.85M、1.02M NaCl 洗脱得到 11 种分子。下面对其洗脱浓度的不同组分进行检测。

当上样时，低分子量在洗脱物中。将它们在第二种 QMA - 凝胶柱上纯化，并在 0.05M, 0.08M, 0.12M, 0.20M 和 0.27M NaCl 洗脱。

实施例 2 活性

除了在 Q hyper DTM 20 - 凝胶上于 0.32M 和 QMA - 凝胶上于 0.12M 分离的分子具有明显的细胞生长抑制活性之外，在实施例 1 中分离的分子表现对所有动物或人体细胞很高的促有丝分裂能力。

实施例 3 毒理学研究

体内和体外进行的测试都表明根据本发明的活性成分具有低毒性和良好耐受性。

用中性红和 MTT 在体外测定细胞毒性。在 600 μ g/ml 剂量时，在培养基中没有检测到毒性。

进行下列体内测试。所有表现促细胞分裂活性的分子在小鼠上进行测试。此研究证明没有毒性。对 24 只雌性动物和 24 只雄性动物两组动物腹膜内注射 0.5ml 100g/l 每种这些分子的溶液，7 天后不引起任何死亡。

使用抑制细胞生长的分子，用同样剂量进行相同测试。实验开始在处理动物中观察到 3 - 4 % 的平均体重减少。在雌性和雄性中都是这种结果。注射后 4 - 5 天，动物恢复了它们的正常生长，这证明根据本发明的分子没有毒性。

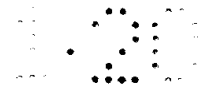
实施例 4 药理学研究

此处所报告的药理学测试结果表明了根据本发明的活性成分的显著性能。

1. 促有丝分裂活性

使用带 6 个加样孔的 NUNC 平板和 HAM F12 培养基在 CRFK 和 VERO 细胞株系上进行测试。

将含 200,000 细胞/ml 的培养基铺开。相对于仅含 HAM F12 和 HAM F12 + 10 % 胎牛血清 (FCS) 的对照，在细胞培养物中对以 0.025g/l-4g/l 剂量的每种分子进行测试。



对于每种分子，根据活性决定最佳浓度范围。正常的活性在 0.05g/l 和 0.5g/l 之间存在。

依赖于所测分子，即在 200,000 细胞/ml、600,000 - 1,000,000 细胞/ml 的起始含量，检测到的细胞增殖率在 3 和 5 之间变动。增殖率与用 SVF 细胞(900,000-1,000,000 细胞/ml)得到的数值相同。

随后在超过 120 个细胞系上测试根据本发明的分子的促有丝分裂能力，这些细胞从 ATCC 得到，或来自原始培养物、动物、真核、人类或二倍体细胞。

除了它们对细胞系的活性，观察到在 0.09M, 0.15M, 0.70M, 0.85M 和 1.02M 洗脱的分子同样表明对微生物的显著扩增能力。在乳杆菌属上进行的测试表明相对于对照，在 24 小时中生物物质增加了 30 %。

2.抑制活性

在同样条件下进行的测试中，在 Q Hyper DTM 20 - 柱上于 0.32M 洗脱的分子和在 QMA 柱上于 0.12M 洗脱的分子以 0.5g/l - 1g/l 的剂量产生对细胞生长的完全抑制。

这两种分子同样抑制来自全国癌症研究中心 (NCI) 的肿瘤细胞所有实验对象 (62 个贮备种) 的生长。

3.对体内代谢的影响

用在 Q Hyper DTM 20 - 柱上于 0.21M, 0.45M 洗脱的分子和在 QMA - 柱上于 0.20M 洗脱的分子进行此项实验。24 只雄性小鼠和 24 只雌性小鼠组成的群体分别接受 0.5ml 100g/l 测试分子的溶液。

相对于只接受 0.5ml 100g/l 氯化钠溶液注射的对照群体，本发明的分子在雄性和雌性小鼠中引起 8.25 % 的平均体重增加。